

論文内容要旨

題 目 骨芽細胞から骨細胞への分化に伴う
カルシウム感受性レセプターの発現

著 者 三 木 善 樹

内容要旨(和文約1,500字)

【目的】歯科矯正治療において、骨整形力および歯の移動に伴い骨の吸収と形成、すなわち、リモデリングが行われている。骨を構成する細胞には、主として骨吸収に関わる破骨細胞、骨形成に関わる骨芽細胞、自ら形成した骨基質に埋め込まれた骨細胞の3種がある。中でも骨細胞は骨組織を構成する細胞中で最も数が多く、多くの突起を伸ばして他の骨細胞や骨表面の骨芽細胞、破骨細胞とギャップジャンクションを介して細胞間ネットワークを形成し、外界の変化を察知できる状態にある。現在までのところ、そのシグナル物質として細胞内カルシウム(Cai)が重要な役割を果たしていると考えられ、骨表面の骨吸収部位での情報を骨細胞が骨深部へ伝達する役割をもつ可能性が示唆されている。一方、骨細胞は骨芽細胞より分化するが、分化に伴い細胞小器官の消失、核対細胞質比率の増加等の形態的变化をすることは知られている。しかし、分化に伴う骨細胞の機能的な変化はほとんど不明である。

本研究では、新生仔ラット頭蓋冠をコラゲナーゼおよびキレート剤にて処理し、骨細胞の分化段階の異なる6つの分画を得、分化に伴う骨細胞の機能について検討した。

【方法】骨系細胞は新生仔ラット頭蓋骨よりまずコラゲナーゼにて分画Iから分画IVを、次にEDTAにて分画Vを、最後に再びコラゲナーゼにて分画VIを得た。単離した各分画の細胞はglass-bottomed culture dish内で2%FBSを含む α -MEMを加えて培養した後、細胞内カルシウムインジケータであるIndo-1AMを取り込ませ、ACAS570にてCaiの経時的変化を追った。また、分化の指標としてアルカリフォスファターゼ(ALPase)活性、オステオカルシン遺伝子の発現を調べた。さらにCaiの上昇の機序を検討するために分画VIの細胞のカルシウムチャンネルモジュレーターによる影響、カルシウム感受性レセプター遺伝子の発現を調べた。

【結果および結論】

- 1) 分画Iの細胞は細長く、紡錘形をしており、線維芽細胞と思われる形態をしていた。分画IIから分画IVの細胞は星状あるいは多角形をしており、骨芽細胞と思われる形態をしていた。分画VIの細胞は大きさが小さく、細胞突起を多数出しており、成熟した骨細胞と思われる形態をしていた。
- 2) 骨芽細胞の分化のマーカーであるALPase活性、オステオカルシン遺伝子の発現は分画IIIで最も高く、骨芽細胞の性質を示した。
- 3) 細胞外カルシウム(Cae)の上昇に対する感受性は分化に伴って上昇し、分画VIが最も高かった。
- 4) 分画VIの細胞はCaeの濃度に依存して即時的にCaiが上昇し、1.0mM以上の濃度より観察された。この上昇は膜脱分極や電位依存性カルシウムチャンネルに依存しなかった。
- 5) 分画VIの細胞にカルシウム感受性レセプター遺伝子の発現がみられた。

以上の結果より、ラット骨芽細胞から骨細胞への分化に伴いカルシウム感受性レセプターが発現し、Caeの変化に応答することが明らかとなった。

②

論文表題：骨芽細胞から骨細胞への分化に伴う

骨芽細胞から骨細胞への分化に伴う

カルシウム感受性レセプターの発現

著者名：三木 善樹

所属：徳島大学歯学部歯科矯正学講座

(主任：山本 三木 善樹)

キーワード：骨細胞、カルシウム感受性レセプター、

Differentiation-dependent Expression of a Calcium

Sensing Receptor in Cultured Rat Osteocytes.

1. 原稿論文

Yoshiki MIKI

2. 原稿枚数：表紙1枚、本文27枚、文獻5枚、

図の説明2枚、英文抄録1枚

徳島大学大学院歯学研究科

歯科矯正学講座（指導：山本照子教授）

3. 学位論文

Department of Orthodontics,

Graduate School of Dentistry,

The University of Tokushima

(Director : Teruko Takano-Yamamoto)

骨芽細胞から骨細胞への分化に伴う
カルシウム感受性レセプターの発現

三木 善樹

Differentiation-dependent Expression of a Calcium
Sensing Receptor in Cultured Rat Osteocytes.

Yoshiki MIKI

徳島大学大学院歯学研究科
歯科矯正学講座（指導：山本照子教授）

Department of Orthodontics,
Graduate School of Dentistry,
The University of Tokushima
(Director : Teruko Takano-Yamamoto)

論文表題：骨芽細胞から骨細胞への分化に伴う
カルシウム感受性レセプターの発現

著者名：三木 善樹

所属：徳島大学歯学部歯科矯正学講座
(主任：山本 照子 教授)

キーワード：骨細胞、カルシウム感受性レセプター mRNA、
細胞外カルシウム、オステオカルシン mRNA、
アルカリフォスファターゼ活性

1. 原著論文

2. 原稿枚数 表題 1 枚、本文 27 枚、文献 6 枚、

図の説明 2 枚、英文抄録 1 枚

図 4 枚 (図 3、図 5 ~ 図 7)

写真 3 枚 (図 1、図 2、図 4)

表 1 枚

3. 連絡先 徳島大学歯学部歯科矯正学講座

Differentiation-dependent Expression of a Calcium Sensing Receptor in Cultured Rat Osteocytes.

Yoshiki MIKI

Department of Orthodontics, Graduate School of Dentistry, The University of Tokushima

Abstract : Osteocytes enclosed within the lacunae of the canalicular network of bone originate from osteoblasts. The six different populations of bone cells from 1-to 2-day-old rat calvaria were sequentially dissociated by treatments with collagenase and chelating agents. Since the calvarial bone cells are released starting from the surface to the interior, cells dissociated at different digesting time should reflect the different stages in bone cell differentiation. Each population of primary cells were compared and characterized; the results obtained are as follows.

- 1) Cells from fraction I were elongated in shape and grew fast. Cells from fractions II, III and IV had a stellate and polygonal shape. Cells from fraction VI were small and stellate-shaped and possessed a large number of long cytoplasmic processes.
- 2) The differentiation markers of osteoblasts such as ALPase and osteocalcin gene were expressed strongly in fraction III cells, suggesting that these cells possess the osteoblastic phenotype.
- 3) The cells from fraction VI increased cytosolic calcium ion ($[Ca^{2+}]_i$) most strongly in response to the elevation of extracellular calcium ion ($[Ca^{2+}]_e$).
- 4) Exposure of the cells from fraction VI to high concentration of $[Ca^{2+}]_e$ caused a concentration-dependent increase in $[Ca^{2+}]_i$. This $[Ca^{2+}]_e$ -induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation was independent of the membrane potential and of voltage-dependent calcium channels.
- 5) A positive signal for calcium-sensing receptor (CaSR) mRNA was expressed only in fraction VI cells.

These results suggested that rat mature osteocytes express a CaSR that responds to elevated $[Ca^{2+}]_e$

緒言

骨細胞は骨芽細胞が自ら分泌した骨基質中に埋もれて分化した細胞で、骨組織を構成する細胞中で最も数が多く、その数は1立方ミリメートル当たり2万5千個にもものほる¹⁾。また、骨中における骨細胞はギャップジャンクションを介して互いに連絡し、骨表面の細胞と連結して細胞間ネットワークを形成する^{2~4)}。さらに骨細胞は骨細管中を流れる細胞外液を介して外界の変化を察知できる状態にある^{5~7)}。これらの特徴から、骨細胞は骨組織の代謝において何らかの重要な役割を演じていると考えられている。骨細胞の機能としては、骨基質の形成と石灰化^{8、9)}、メカニカルストレスの伝達^{10、11)}、カルシウムホメオスタシスの維持¹²⁾、骨細胞性骨溶解¹³⁾などが考えられている。しかし、骨細胞は周囲を硬組織に囲まれているため単離が困難で、その生化学的検討はほとんどなされていなかった。近年、骨細胞の単離方法が開発され^{14、15)}、その機能的な面での研究が急速に進みつつある。Kamiookaらはニワトリ骨細胞を単離し、骨細胞の細胞外液のカルシウム濃度を1.0 mMから25 mMまで上昇させると、濃度依存的に細胞内カルシウムの上昇がみられることを見いだした¹⁶⁾。

一方、骨細胞は骨芽細胞からの分化に伴い骨芽細胞

にみられるいくつかの特徴¹⁷⁾が失われる。すなわち、粗面小胞体、ミトコンドリア、著明に発達したゴルジ装置等の細胞小器官が消失し、細胞自体も小さくなる。Palumboによると、骨細胞の体積はもとの骨芽細胞に比べ、類骨骨細胞で30%、成熟した骨細胞で70%の減少がみられ、それに伴い細胞質に対する核の占める割合が大きくなる¹⁸⁾。現在、骨芽細胞は骨細胞への分化に伴い5'-ヌクレオチダーゼやCD44の発現を増加させ¹⁹⁻²¹⁾、オステオカルシン遺伝子の発現を減少させる²²⁾ことが知られているが、骨系細胞の分化に関する機能的な変化についての詳細は明らかではない。

本研究では、新生仔ラット頭蓋冠をコラゲナーゼおよびキレート剤にて処理し、分化段階の異なる6種の骨系細胞の分画が得られたことから、これらの細胞分画を用いて、分化に伴う骨系細胞の機能的な変化について検討を行った。

材料ならびに方法

1. 試薬類

本研究で利用した試薬類とその入手先は次の通りで

ある。α - 変法 Eagle 最小必須培地（以下 α - MEM と略記する；Flow Laboratories, Mclean, VA）、牛胎仔血清（以下 FBS と略記する；Bioproducts, Inc., Walkvilles, MD）、細胞分散用コラゲナーゼ、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（以下 EDTA と略記する）、塩化カルシウム、塩化カリウム、50×デンハルト溶液（和光純薬工業株式会社、大阪）、ニフェジピン、ニカルジピン、ファストブルー RR、ナフトール AS-BIリン酸、硫酸デキストランナトリウム、トリスアミノメタン、t-RNA（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）、BAY K 8644（Biomol Research Laboratories, Plymouth Meeting, PA）indo-1/AM 溶液（株式会社同仁化学研究所、熊本）。

2. 細胞の単離

ラット骨系細胞は、van der Plus と Nijweide^{1,4)}の方法に準じて単離した。すなわち、生後1～2日齢のSprague-Dawley系ラット（チャールズリバー・ジャパン、東京）の頭蓋冠を取り出し、軟組織を取り除いた後、Heffley^{2,3)}のHEPES緩衝液（25 mM HEPES, 10 mM NaHCO₃, 100 mM NaCl, 3 mM K₂HPO₄, 1 mM

C a C l 2 , 3 0 m M K C l , 1 m g / m l B S A ,
5 m g / m l g l u c o s e , 7 . 5 μ M N α - p -
T o s y l - L - L y s i n e C h l o r o m e t h y l
K e t o n e) に 1 m g / m l の コ ラ ゲ ナ ー ゼ を 加 え た 溶 液
で 3 7 $^{\circ}$ C 、 2 0 分 間 の 処 理 を 4 回 行 い 、 そ れ ぞ れ の 処 理
後 に 遊 離 し て き た 骨 基 質 表 面 の 細 胞 を 単 離 し た (分 画
I ~ I V) 。 こ の 処 理 で 骨 基 質 表 面 の 細 胞 は ほ と ん ど 除
去 さ れ た 。 そ の 後 、 C a $^{2+}$, M g $^{2+}$ を 除 い た 1 0 m M リ
ン 酸 緩 衝 生 理 食 塩 水 (p H 7 . 4) (以 下 、 P B S (-)
と 略 記 す る) に 0 . 1 % の 牛 血 清 ア ル ブ ミ ン (S i g m a
C h e m i c a l C o .) と 5 m M の E D T A を 加 え た 溶 液
で 3 7 $^{\circ}$ C 、 3 0 分 間 の 処 理 を 行 い 骨 基 質 を 脱 灰 し 、 遊 離
し て き た 細 胞 を 単 離 し た (分 画 V) 。 さ ら に 、 脱 灰 さ
れ コ ラ ー ゲ ン 線 維 と 骨 細 胞 だ け と な っ た 骨 片 を 、 再 び
コ ラ ゲ ナ ー ゼ 溶 液 に て 3 7 $^{\circ}$ C 、 2 0 分 間 の 処 理 を 行 い 、
骨 細 胞 を 単 離 し た (分 画 V I) 。

3 . 細 胞 の 培 養

単 離 さ れ た 各 分 画 の 細 胞 は 3 5 m m 径 ガ ラ ス ボ ト ム
プ ラ ス チ ッ ク ペ ト リ 皿 (M e r i d i a n
I n s t r u m e n t s , O k e m o s , M I) 、 ま た は 3 5 m m 径
プ ラ ス チ ッ ク ペ ト リ 皿 (F a l c o n , L i n c o l n
P a r k , N J) に 1 . 0 \times 1 0 4 個 / d i s h の 濃 度 で ま き 、

2 % F B S を 含 む α - M E M 中 で 、 3 7 $^{\circ}$ C 、 5 % C O ₂ / 9 5 % 空 気 の 気 相 下 で 2 4 時 間 培 養 し た 。

4 . ク リ オ ス タ ッ ト 凍 結 切 片 の 作 製

各 消 化 段 階 で 残 存 し て い る 骨 片 は 、 4 % パ ラ ホ ル ム ア ル デ ヒ ド に て 固 定 後 T i s s u e - T e k ^{T M} O . C . T c o m p o u n d (M i l e s I n c . , E l k h a r t , I N) に 包 埋 し 、 切 片 を 作 製 す る ま で - 8 0 $^{\circ}$ C で 保 存 し た 。 ク リ オ ス タ ッ ト (H i s t o s t a t ^{T M} C r y o s t a t M i c r o t o m e , A O S c i e n t i f i c I n s t r u m e n t s , B u f f a l o , N Y) を 用 い て 厚 さ 約 4 μ m の 凍 結 切 片 を 作 製 し 、 切 片 は マ イ ヤ ー の ヘ マ ト キ シ リ ン 溶 液 (和 光 純 薬 工 業 株 式 会 社) 、 1 % エ オ ジ ン 溶 液 を 用 い て 染 色 後 、 光 学 顕 微 鏡 で 観 察 し た 。

5 . 細 胞 内 カ ル シ ウ ム 濃 度 の 測 定

ガ ラ ス ボ ト ム プ ラ ス チ ッ ク ペ ト リ 皿 に て 培 養 し た 各 分 画 の 細 胞 は 、 5 μ M i n d o - 1 / A M を 含 む α - M E M に 交 換 し さ ら に 3 7 $^{\circ}$ C 、 5 % C O ₂ / 9 5 % 空 気 の 気 相 下 で 3 0 分 間 培 養 し て 細 胞 に i n d o - 1 / A M を 取 り 込 ま せ た 。 そ の 後 p h o s p h a t e - f r e e 培 地 (1 2 5 m M N a C l , 5 m M K C l , 1 g / l d e x t r o s e , 2 5 m M H E P E S ; p H 7 . 4) に 交 換 し 、 付 着 細 胞

機能分析装置 (A C A S 5 7 0 , M e r i d i a n I n s t r u m e n t s) にて個々の細胞ごとの蛍光強度を室温で測定した。細胞内カルシウム濃度は励起波長 3 5 5 n m (U V) 、測定波長 4 0 5 n m および 4 8 5 n m の 2 波長にて測定ポイントの間隔 1 . 0 μ m 、測定間隔 1 0 秒、測定回数 3 0 ~ 4 0 回で測定した。

6 . ア ル カ リ フ ォ ス フ ァ タ ー ゼ 活 性 (以 下 、 A L P a s e 活 性 と 略 記 す る) の 測 定

L o w r y ら²⁴⁾の方法に従い A L P a s e 活性を測定した。すなわち、各分画で回収された細胞を 0 . 0 2 % の ノニデット P - 4 0 (ナカライテスク株式会社、京都) を溶解させた P B S (-) 中で氷冷下 1 5 秒間、超音波により粉碎 (超音波発生装置、和研薬株式会社、京都) した後、4 $^{\circ}$ C、2 0 0 0 \times g で 1 5 分間遠心分離し、上清を酵素液とした。酵素液は 1 M トリス塩酸緩衝液 (p H 9 . 0) に溶解した基質、p - ニトロフェニルリン酸とともに 3 7 $^{\circ}$ C、1 時間反応させ、遊離した p - ニトロフェノールの吸光度を 4 0 5 n m で測定し、これを A L P a s e 活性値とした。

7 . タ ン パ ク 質 の 定 量

タンパク質の定量は B r a d f o r d²⁵⁾の方法に準じ、

牛血清アルブミンを標準タンパクとし、BCA Protein Assay Reagent (Pierce Chemical, Co., Rockford, IL)を用いて行った。

8. ALPase 染色

Burstone の渡辺変法²⁶⁾によりALPase染色を行った。すなわち、プラスチックペトリ皿にて培養した各分画の細胞を10%ホルマリンにて固定し、ナフトールAS-BIリン酸とファストブルーRRを0.05mole/l 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール緩衝液(pH9.8)に溶解したALPase反応液を室温、20分間作用させた後、ベロナール酢酸緩衝液(pH4.0)にメチルグリーンを溶解した1%メチルグリーン核染色液にて核染色した。

9. プローブの作製

BluescriptにサブクローニングしたラットオステオカルシンcDNA(0.47kB)、ラットカルシウム感受性レセプター(1411~1752B)²⁷⁾cDNAより、T7、SP6、あるいはT3 RNAポリメラーゼを用いてジゴキシゲニン-11-UTP標識cRNAプローブを作製した。センスプローブはネガティブコントロールとして使用した。

10. In situ ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは Nomura らの方法²⁸⁾に基づき非アイソトープ系において行い、mRNA の発現を検討した。

1) 前処置

プラスチックペトリ皿にて培養した各分画の細胞はジエチルピロカルボン酸 (片山化学、大阪) 処理水 (以下、DEPC-W と略記する) に溶解した70%エタノールにて固定した後、0.2Nの塩酸にて内在性のアルカリフォスファターゼを失活させた。続いて試料を0.1Mトリエタノールアミン塩酸緩衝液 (pH 8) で平衡化し、0.25%無水酢酸でアセチル化した。その後、アルコール脱水、風乾させ、ハイブリダイゼーションに用いた。

2) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション溶液 (50% ホルムアミド、10% 硫酸デキストランナトリウム、1×デンハルト溶液、600 mM 塩化ナトリウム、10 mM トリスアミノメタン、0.25% ドデシル硫酸ナトリウム、150 μ g/ml t-RNA、1 mM EDTA) に0.5 μ g/mlのジゴキシゲニン-11-UTP標識RNAプローブを溶解し、85℃、3分間の処理を行った後、50 μ l/dishで溶液を滴下、ラボフィルムで被い、50%

ホルムアミドで浸したモイスチャーチャンバー中で50℃、16時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、5×SSC（1×SSC=150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウム）中でラボフィルムを剥離し、50%ホルムアミドを含む2×SSC中で50℃、30分間作用させ、余分なプローブを除去した。次いで、2×SSCで1回、0.2×SSCで2回、いずれも50℃、15分間の洗浄を行った。

3) 免疫組織化学

洗浄後、DIG緩衝液1（100mMトリスアミノメタン（pH7.5）、150mM塩化ナトリウム）に1.5%のブロッキング剤（ベーリンガー・マンハイム株式会社、東京）を溶解させた溶液を室温にて60分間作用させた後、DIG緩衝液1に溶解させたポリクローナル抗ジゴキシゲニンヒツジ抗体、Fabフラグメント（アルカリ性フォスファターゼ標識、750U/ml）（ベーリンガー・マンハイム株式会社）を室温にて30分間作用させた。続いて、DIG緩衝液1で15分間、DIG緩衝液3（100mMトリスアミノメタン（pH9.5）、150mM塩化ナトリウム、50mM塩化マグネシウム）で3分間洗浄した後、337.5μg/mlニトロブルーテトラゾリウム塩と165μg/ml5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルリン酸を

溶解したDIG緩衝液3を作用させ、室温にて一夜反応させ発色させた。発色反応は10 mM トリスアミノメタン (pH 8) と2 mM EDTAを含む溶液で停止させ、クリスタルマウント (Biomed a, Foster City, CA) にて封入した。

11. RT-PCR法

RT-PCR法 (Reverse transcriptase polymerase chain reaction) を用い、カルシウム感受性レセプター遺伝子の発現を検討した。

1) 総RNAの抽出

新生仔ラットから摘出した骨細胞のみを含む骨片 (頭蓋冠をEDTAにて処理した後の骨片)、肝臓、腎臓、肺の各種臓器からのmRNAの分離はAGPC法 (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform method)²⁹⁾ に準じた。すなわち、ホモジナイズされた前述の摘出臓器にsolution D (4 M グアニジンチオシアン酸、25 mM クエン酸ナトリウム (pH 7)、0.5% サルコシル、0.1 M 2-メルカプトエタノール、DEPC-W)、0.2 M 酢酸ナトリウム (pH 4)、フェノール、クロロホルムをそれぞれ1:0.1:1:0.2の割合で溶解した抽出液を加え、4℃、12000×gで15分間遠心

した上清に等量のイソプロピルアルコールを加え、4℃、12000×gで10分間遠心した。DEPC-Wによって75%に希釈したエタノールを沈殿に加え、4℃、7500×gで5分間遠心した後エタノールを除去、乾燥させ、DEPC-Wに溶解し総RNA溶液とした。

2) 逆転写反応、PCR

得られた総RNAからの逆転写反応、PCRにはRNA PCRキット（宝酒造、京都）を用いた。すなわち、cDNA合成はオリゴdTをプライマーに用い、AMV (Avian Myeloblastosis Virus) 由来の逆転写酵素を加え、42℃、30分間反応させた。その後、99℃、5分間加熱し反応を停止させ、cDNAを得た。PCRは後述のプライマーを用い、TaqポリメラーゼによるcDNA増幅をサーマルサイクラー（宝酒造社製）内にて94℃、1分間の熱変性、55℃、1分間のアニーリング、72℃、1.5分間のポリメラーゼ反応を35サイクルで行った。

3) プライマーの作製および塩基配列

プライマーはライフテックオリエンタル株式会社に合成依頼した。プライマーは少なくとも20塩基以上、GC含有40～60%でヘアピンループを作らず、他の遺伝子との相同性の少ない領域をGenbank、EMBLのデータをもとに決定した。本実験でRT-

P C R 法 に 用 い た プ ラ イ マ ー は 以 下 の 通 り で あ る 。

5' : C T C C A G C A C C G C A G C A C A T G

3' : A G G A A G G A C C C A T C C T T T T G

1 2 . 統 計 処 理

実 験 デ ー タ の 有 意 差 検 定 は 、 S t u d e n t ' s t -
t e s t に よ り 行 っ た 。

結 果

1 . 各 分 化 段 階 に お け る 骨 系 細 胞 の 形 態 的 特 徴

各 消 化 段 階 で 残 存 し て い る 骨 片 は ク リ オ ス タ ッ ト 凍
結 切 片 を 作 製 し 、 ヘ マ ト キ シ リ ン ・ エ オ ジ ン 染 色 を 施
し 、 組 織 学 的 に 検 討 し た (図 1) 。 摘 出 し た 直 後 の 骨
片 に は 、 表 層 に 多 く の 線 維 芽 細 胞 が 存 在 し て い る の が
み ら れ た (図 1 A) 。 コ ラ ゲ ナ ー ゼ に よ る 処 理 を 2 回
行 っ た 後 の 骨 片 に は 、 骨 表 面 に 骨 芽 細 胞 の 層 が 存 在 し
て い る の が み ら れ た (図 1 B) が 、 さ ら に E D T A に て
処 理 し た 後 の 骨 片 に は 、 骨 芽 細 胞 の 層 は 完 全 に 消 失 し 、
骨 基 質 中 に 埋 も れ た 成 熟 し た 骨 細 胞 の み が 残 存 し て い
る の が 認 め ら れ た (図 1 C) 。

消 化 段 階 の 進 行 と と も に 骨 表 面 の 細 胞 は 表 層 か ら 剥

離されていくのが観察されたので、次に各分画で回収された骨系細胞の個数について検討した（表1）。最も細胞収量が多いのは分画Iで、以後、分画IVまで段階が進むにつれて回収される細胞数は減少していった。EDTAによって処理した分画Vの細胞数は極端に低く、ほとんど回収されなかった。

図2A, B, Cに単離後1日培養した後の各分画の細胞の位相差顕微鏡像を示す。分画Iの細胞の形態は細長く、紡錘形をしており、線維芽細胞と思われる形態をしていた（図2A）。分画IIから分画IVの各段階の細胞の形態は星状あるいは多角形で、骨芽細胞と思われる形態をしていた（図2B）。分画Vの細胞は細胞突起を伸長するものの、細胞の大きさは分画IIIの細胞と変わらず、幼若な骨細胞と思われる形態をしていた。分画VIの細胞は小型で、細胞突起を多数伸長して星状ないしは樹枝状をしており、成熟した骨細胞と思われる形態をしていた（図2C）。この細胞を数日間培養し続けても細胞は分裂しなかった（三木ら未発表）。

2. 各分画の骨系細胞の特徴

1) ALPase 活性

各分画の骨系細胞について、骨芽細胞の分化マーカーである ALPase 活性の発現を検討した（図 2D～F、図 3）。その結果、ALPase 染色によって分画 III の細胞が最も強い陽性所見を示した（図 2E）。一方、分画 VI の細胞は陰性所見を示した（図 2F）。さらに、各分画の骨系細胞の ALPase 活性を細胞ホモジネートについて定量すると、分画 III、分画 IV の細胞は高い活性を示し、その他の分画の細胞では活性は低く、酵素組織化学の結果とよく一致した（図 3）。

2) オステオカルシン遺伝子の発現

In situ ハイブリダイゼーション法にてオステオカルシン遺伝子の発現を検討した（図 2G～I）。オステオカルシン遺伝子の発現は、ALPase 活性の結果と同様、分画 III の細胞に高く発現していることが観察された（図 2H）。

3) カルシウム感受性レセプター遺伝子の発現

各分画の骨系細胞においてカルシウム感受性レセプター遺伝子は、オステオカルシン遺伝子の発現の場合と異なり、分画 I, III の細胞には発現がみられず、分画 VI の細胞に発現していることが観察された（図 2J～O）。さらにカルシウム感受性レセプターの発

現を R T - P C R 法を用いて検討した (図 4) 。 E D T A 処理によって骨細胞のみが残存している骨片から総 R N A を得た。対照として、カルシウム感受性レセプターの存在が報告されているラットの肝臓、腎臓、肺^{27, 30)}をホモジナイズし、総 R N A を抽出した。これらの試料を用いて R T - P C R を行った結果、骨細胞にカルシウム感受性レセプター遺伝子が発現していることを認めた。

3. 細胞外液カルシウムに対する骨系細胞の応答性

単離した各分画の細胞の細胞外液に 30 m M の高濃度のカルシウムを添加したとき、分画 I I ~ V I の細胞の細胞内カルシウムの上昇は、分画 I の細胞のそれに比べて有意に高く、さらに分画 V I の細胞は細胞外カルシウムの上昇に最も高い応答能を有していることが明らかとなった (図 5) 。

次に、外液カルシウムに最も高い応答能を有する分画 V I の細胞についてさらに検討を加えた。本実験で用いた分画 V I の細胞は、静止状態 (無刺激) の時、細胞内カルシウム濃度は 137 ± 16.7 n M ($n = 64$) であった。この細胞に細胞外からカルシウムを作用させると、濃度依存性に細胞内カルシウムが上昇した (図 6) 。しかし、細胞外液カルシウム濃度を生理的

濃度の 1 m M 以下にすると細胞内カルシウムの上昇は観察されなかった。

分画 V I の細胞を用いて、細胞内カルシウムの上昇が細胞膜の脱分極、あるいは電位依存性カルシウムチャンネルによるものかどうかを検討した (図 7)。生理的濃度の細胞外液カルシウムが存在している状態で細胞膜が脱分極するのに十分な濃度のカリウムイオンを作用させても、細胞内カルシウムは上昇しなかった (図 7 B, C)。さらに、電位依存性カルシウムチャンネルのアゴニストである B A Y K 8 6 4 4³¹⁾ は 1, 25, 50 μ M のいずれの濃度を作用させても細胞内カルシウムを上昇させなかった (図 7 D)。また、同タイプのチャンネル阻害剤であるニカルジピン³²⁾ (1 - 100 n M) およびニフェジピン³³⁾ (1 - 50 μ M) を作用させた後、30 m M のカルシウムを添加すると細胞内カルシウムは上昇し、阻害剤による影響は全く認められなかった (図 7 H, I)。

考 察

本研究では、生後 1 ~ 2 日齢新生仔ラット頭蓋冠をコラゲナーゼおよび E D T A にて処理し、分化段階の

異なる骨系細胞を単離培養した。処理時間とともに解離した各分画の細胞を用いて分化と骨系細胞の機能との関連性を検討した。

各分画で回収される骨系細胞の細胞数は、頭蓋冠の摘出に用いられる新生仔ラットの成育状態、単離の作業状況により大きく影響され、本研究で用いた1～2日齢よりも日齢が上がると、骨の石灰化が進み、骨細胞が回収されにくくなる。骨系細胞はコラゲナーゼ処理によって骨表層の細胞より順に緩衝液中に遊離してくるので、各分画で回収される骨系細胞は骨細胞の分化の段階を反映している。20分間のコラゲナーゼ処理を順次行っていくと、回収される細胞数は徐々に減少してゆき、4回目のコラゲナーゼ処理を行った時点で回収される分画IVでは細胞数は最も少なく、骨表面の細胞はこの段階でほとんど取り除かれてしまうと考えられる。このことは組織学的に検討した結果と一致した。その後のEDTAによる処理によって初めて骨基質が脱灰され、骨表面と石灰化骨との間にある類骨中に存在する類骨骨細胞、すなわち、骨芽細胞から分化して間もない幼若な骨細胞が回収される。この段階で回収される分画Vの細胞数が極めて少ないのは、EDTAにより細胞が強く損傷を受けているか、あるいは細胞数がもともと少ないためだと考えられる。

EDTA処理により骨片には骨小腔中に存在する成熟した骨細胞のみが残っていた。この段階で、骨細胞は脱灰されずに残った骨基質中のコラーゲン線維にからまった状態にあり、再びコラゲナーゼ処理を行うことにより残存していた成熟骨細胞が緩衝液中に遊離してくるようになる。一方、骨基質中には骨細胞は 1 mm^3 あたり25,000個程度存在している¹⁾。しかし、本実験で回収された分画V Iの成熟骨細胞はわずか $1.34 \pm 0.51 \times 10^4$ 個/頭蓋冠にすぎず、細胞の回収効率が極めて低い。今後、回収効率を上げる方法を検討する必要があると考えられる。

単離培養された各分画の骨系細胞を特徴づけるために骨芽細胞の分化の指標であるALPase活性について検討した。図3で示したように、ALPase活性は分画III、IVの細胞で高く、その他の細胞は活性が低かった。これは図2で示した酵素組織化学の結果と一致した。以上より、分画III、IVの細胞は骨芽細胞の特性を持っていることが示唆された。

オステオカルシンは分子量5.8 kDa、ビタミンK依存性の γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) を含むタンパクで、骨の基質中にはコラーゲンについて多く含まれている^{3,4)}。オステオカルシンは骨芽細胞によって合成され、ハイドロキシアパタイトに結合できる

34、35)。7週齢の雄性SDラットの歯の移動時の歯周組織ではin situハイブリダイゼーション法により骨芽細胞にオステオカルシン遺伝子の発現がみられるが、骨細胞には発現しないことが報告されている。すなわち、オステオカルシンも骨芽細胞の分化の指標とされている³⁶⁾。そこで、単離した分画I、III、VIの細胞において、オステオカルシン遺伝子の発現をin situハイブリダイゼーション法により検討した。図2で示したように、分画IIIの細胞のオステオカルシン遺伝子が最も強いシグナルを発現し、分画IとVIの細胞には発現は認められなかった。以上の実験結果から、分画IIIの細胞が骨芽細胞で、分画VIの細胞は骨細胞であることが示唆された。

そこで骨細胞であると思われる分画VIの細胞について調べた。生理的濃度の細胞外液のカルシウム濃度は約1 mMであるが、破骨細胞の骨吸収窩内ではカルシウム濃度は40 mMにまで上昇することが知られている³⁷⁾。本研究において、分画VIの細胞に細胞外液のカルシウム濃度に依存した細胞内カルシウムの上昇がみられ、本分画の細胞は成熟した骨細胞であることがこの実験からも示唆された。なお、図5で示したように、それぞれ線維芽細胞並びに骨芽細胞と考えられた分画IおよびIIIの細胞では細胞外カルシウム依

存性の細胞内カルシウムの上昇はみられなかった。

細胞内カルシウムが上昇する機構として、カルシウムイオンチャンネル、あるいは $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系を介して細胞外から細胞内へカルシウムイオンが流入する場合と、カルシウム感受性レセプターを介して小胞体などの細胞内のカルシウムプールからカルシウムが放出される場合が考えられる³⁸⁾。本研究では、骨細胞にみられた細胞内カルシウムの上昇がこれら3つの系のうち、いずれの系を介して行われるかを検討した。図7で示したように、細胞膜を脱分極させるのに十分な濃度のカリウムイオンを骨細胞の細胞外液に添加させた結果、細胞内カルシウムは上昇しなかった。このことより、膜電位により影響を受ける起電性の $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換系の輸送活性は働いていないことがわかった。さらに、膜電位依存性L型カルシウムイオンチャンネル拮抗剤であるニカルジピンとニフェジピンを骨細胞の細胞外液に添加した後に、高濃度のカルシウムを作用させても、細胞内カルシウムは上昇し、カルシウムイオンチャンネル拮抗剤による抑制はなかった。したがって、骨細胞の細胞内カルシウムの上昇にカルシウムイオンチャンネルは関与していないと考えられた。

副甲状腺主細胞^{39~43)}、甲状腺のC細胞^{44、45)}

において、細胞外カルシウムが引き金となる細胞内カルシウムの上昇にはカルシウム感受性レセプターが関与していると考えられている。最近、Brownら⁴⁶⁾はウシの副甲状腺主細胞よりカルシウム感受性レセプターをクローニングし、このレセプターがG-タンパク質共役型受容体であることを示した⁴⁷⁾。ラットにおいても副甲状腺や腎臓など、さまざまな臓器からカルシウム感受性受容体がクローニングされている^{27, 30)}。本研究では、*in situ*ハイブリダイゼーション法とRT-PCR法を用いてカルシウム感受性レセプターの存在について検討した。その結果、図2J~O、図4で示したように、ラットの骨細胞にカルシウム感受性レセプター遺伝子が発現していることが明らかとなった。*In situ*ハイブリダイゼーション法は細胞内のmRNAの発現のみを検出するが、この指標は細胞内にタンパク質を産生していることを強く示唆するものである。したがって、成熟した骨細胞で生じる細胞外カルシウム依存性の細胞内カルシウムの上昇は細胞膜上に存在するカルシウム感受性レセプターを介して行われる可能性が示唆された。カルシウム感受性レセプターは副甲状腺主細胞では0.5 mM以上の細胞外カルシウム濃度に応答し、細胞内カルシウム濃度を上昇させ、PTHの分泌制御に関与していること

が報告されている⁴¹⁾。また、腎臓においてもカルシウム感受性レセプターが発現しており、ミネラルの排泄に関与していると考えられているが、詳細は明確ではない。しかし、本研究で存在が示された骨細胞のカルシウム感受性レセプターは、10 mM以上の細胞外カルシウム濃度に応答して細胞内カルシウム濃度を上昇させるが、生理的濃度の細胞外カルシウムには応答しないことから、副甲状腺主細胞や腎臓に発現しているカルシウム感受性レセプターとはタイプの異なるレセプターが発現していることが推定される。

石灰化した骨基質に深く埋もれた骨小腔内の成熟した骨細胞は増殖せず、細胞の活性も低い。破骨細胞による骨吸収が進むと骨細胞は基質中から放出される。電子顕微鏡による観察で、この放出された骨細胞の一部は破骨細胞によって貪食されることが報告されている^{48、49)}。さらに、骨細胞は骨芽細胞へ脱分化することが示唆されている⁵⁰⁾。本研究において、単離培養した骨細胞は骨基質より放出された骨細胞と類似した環境にあり、これを培養すると、最初の2、3日間は骨細胞の性質を保持しているが、その後細胞は再び増殖能を有するようになり、骨芽細胞様細胞となる。さらに培養し続けると骨芽細胞様細胞は分化し、石灰化が生じる（三木ら未発表）。この観察から、骨細胞は

生体内で骨基質より放出されることが何らかの刺激となり、骨芽細胞に脱分化した後再び骨を形成する可能性が考えられる。

骨のリモデリングは古い骨が吸収され、その部位に新生骨が形成される過程である^{51~53)}。骨は破骨細胞と骨芽細胞による吸収・形成のサイクルを通して絶えず作り替えられており、骨量は吸収と形成のカップリングによって維持されている^{54, 55)}。骨細胞は骨形成を調節するIGF⁵⁶⁾、BMP-6, 7⁵⁷⁾を産生するので、骨細胞が骨芽細胞の形成、骨細胞への分化、骨の形成などに関与していることが示唆される。一方、骨細胞は分子量18.5 kDaの骨吸収抑制因子を産生し、破骨細胞に直接作用してその機能を抑制すると考えられている⁵⁸⁾。さらに骨細胞はプロスタサイクリンのような骨吸収抑制因子を産生して骨吸収を抑制するという報告もある⁵¹⁾。したがって、骨細胞が骨吸収にも重要な役割を担っている可能性があると思われる。

骨細胞は細胞突起を骨細管中に伸ばし、骨細胞同士、あるいは骨表面の細胞と連絡し、細胞間ネットワークを形成している。Jonesら⁵⁹⁾は、ギャップジャンクションを構成するタンパク質であるコネキシン-43の分布を骨系細胞で検討し、細胞同士がギャップジャンクションを介して結合していることを報告している。

さらに、上岡ら⁶⁰⁾は A C A S 570 を用いて、実際に骨細胞同士がギャップジャンクションを介して物質のやりとりを行っていることを確認している。すなわち、細胞間ネットワークは、骨細胞を中心とした骨系細胞間の情報伝達を行うことにより、骨芽細胞および破骨細胞の機能を調節する可能性があるという点から重要な機能であると考えられる。

以上のことから、骨芽細胞から骨細胞へと分化するにつれて、これらの骨系細胞はカルシウム感受性レセプターを発現させて細胞外カルシウムに対する感受性を増大させると考えられた。また、骨細胞は骨代謝を調節するサイトカインを産生したり、あるいはギャップジャンクションを介して骨細胞周辺の骨系細胞の機能を調節することにより骨代謝において重要な役割を果たしていることが考えられた。すなわち、本研究において骨細胞はカルシウムセンサーとしての新たな役割を担っている可能性が強く示唆された。

結 論

ラット頭蓋冠より分化段階の異なる骨系細胞を単離培養した。各分化段階の細胞を特徴づけるためにALPase活性、オステオカルシン遺伝子の発現について比較検討し、以下の結果を得た。

- 1) 分画Iの細胞は細長く、紡錘形をしており、線維芽細胞と思われる形態をしていた。分画IIから分画IVの細胞は星状あるいは多角形をしており、骨芽細胞と思われる形態をしていた。分画VIの細胞は小型で、細胞突起を多数伸長しており、成熟した骨細胞と思われる形態をしていた。
- 2) 骨芽細胞の分化のマーカであるALPase活性、オステオカルシン遺伝子の発現は分画IIIで最も高く、骨芽細胞の性質を示した。
- 3) 細胞外カルシウムの上昇に対する感受性は骨系細胞の分化に伴って上昇し、分画VIが最も高かった。
- 4) 分画VIの細胞は細胞外カルシウムの濃度に依存して即時的に細胞内カルシウムが上昇し、 1.0 mM 以上の濃度より観察された。この上昇は膜脱分極や電位依存性カルシウムチャンネルに依存しなかった。
- 5) 分画VIの細胞にカルシウム感受性レセプター遺

伝子の発現がみられた。

以上の結果より、骨芽細胞から骨細胞への分化に伴いカルシウム感受性レセプターが発現し細胞外カルシウムの変化に応答することが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導御校閲を賜りました徳島大学歯学部歯科矯正学講座山本照子教授に深甚なる謝意を表します。また、本論文の御校閲をいただいた口腔病理学講座林良夫教授、口腔生理学講座細井和雄教授に深謝致します。最後に、本研究の実施に際し御協力を頂いた徳島大学歯学部歯科矯正学講座、口腔生理学講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Parfitt A M : The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory. Clin Orthop 127, 236-247 (1977)
- 2) Doty S B : Morphological evidence of gap junctions between bone cells. Calcif Tissue Int 33, 509-512 (1981)
- 3) Palumbo C, Palazzini S and Marotti G : Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. Bone 11, 401-406 (1990)
- 4) Shapiro F, Cahill C, Malatantis G and Nayak R C : Transmission electron microscopic demonstration of vimentin in rat osteoblast and osteocyte cell bodies and processes using the immunogold technique. Anat Rec 241, 39-48 (1995)
- 5) Kimmel D B : A paradigm for skeletal strength homeostasis. J Bone Miner Res 8 (suppl 2), S515-S522 (1993)
- 6) Lanyon L E : Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. Calcif Tissue Int 53 (suppl 1), S102-S107 (1993)
- 7) Aarden E M, Burger E H and Nijweide P J : Function of osteocytes in bone. J Cell Biochem 55, 287-299 (1994)
- 8) Owen M : Cell population kinetics of an osteogenic tissue. I J Cell Biol 19, 19-32 (1963)
- 9) Baylink D J and Wergedal J E : Bone formation by osteocytes. Am J Physiol 221, 669-678 (1971)
- 10) Piekarski K and Munro M : Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. Nature 269, 80-82 (1977)
- 11) Kufahl R H and Saha S : A theoretical model for stress-generated fluid flow in the canaliculi-lacunae network in bone tissue. J Biomech 23, 171-180 (1990)
- 12) Matthews J L and Martin J H : Intracellular transport of calcium and its relationship to homeostasis and mineralization.--An electron microscope study Am J Med 50, 589-597

(1971)

- 13) Alcobendas M, Baud C A and Castanet J : Structural Changes of the periosteocytic area in *Vipera aspis* (L.)(Ophidia, Viperidae) bone tissue in various physiological conditions. *Calcif Tissue Int* 49,53-57 (1991)
- 14) van der Plus A and Nijweide P J : Isolation and purification of osteocytes. *J Bone Miner Res* 7, 389-396 (1992)
- 15) Mikuni-Takagaki Y, Kakai Y, Satoyoshi M, Kawano E, Suzuki Y, Kawase T and Saito S : Matrix mineralization and differentiation of osteocyte-like cells in culture. *J Bone Miner Res* 10, 231-242 (1995)
- 16) Kamioka H, Sumitani K, Tagami K, Miki Y, Terai K, Hakeda Y, Kumegawa M and Kawata T : Divalent cations elevate cytosolic calcium of chick osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 204, 519-524 (1994)
- 17) Binderman I, Duksin D, Harell A, Katzir E and Sachs L : Formation of bone tissue in culture from isolated bone cells. *J Cell Biol* 61, 427-439 (1974)
- 18) Palumbo C : A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell Tissue Res* 246, 125-131 (1986)
- 19) Doty S B and Schofield B H : Histochemistry and enzymology of bone forming cells. In: Hall, B K (ed) *Bone, The Osteoblast and Osteocyte*. vol 1. Caldwell, NJ, The Telfofa Press, 1990, 71-102
- 20) Hughes D E, Salter D M and Simpson R : CD 44 expression in human bone: A novel marker of osteocytic differentiation. *J Bone Miner Res* 9, 39-44 (1994)
- 21) Nakamura H, Kenmotsu S, Sakai H and Ozawa H : Localization of CD44, the hyaluronate receptor, on the plasma membrane of osteocytes and osteoclasts in rat tibiae. *Cell Tissue Res* 280, 225-233 (1995)
- 22) Hirakawa K, Hirota S, Ikeda T, Yamaguchi A, Takemura T, Nagoshi J, Yoshiki S, Suda T, Kitamura Y and Nomura S : Localization of the mRNA for bone matrix proteins during fracture healing as determined by in situ hybridization. *J Bone Miner Res* 9, 1551-1557 (1994)

- 23) Hefley T J : Utilization of FPLC-purified bacterial collagenase for the isolation of cells from bone. *J Bone Miner Res* 2, 505-516 (1987)
- 24) Lowry O H, Roberts N R, Wu M-L, Hixon W S and Crawford E J : The quantitative histochemistry of brain.--II. Enzyme measurements *J Biol Chem* 207, 19-37 (1954)
- 25) Bradford M M : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254 (1976)
- 26) Watanabe K and Fishman W H : Application of the stereospecific inhibitor L-phenylalanine to the enzymorphology of intestinal alkaline phosphatase. *J Histochem Cytochem* 12, 252-260 (1964)
- 27) Riccardi D, Park J, Lee W-S, Gamba G, Brown E M and Hebert S C : Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium / polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 131-135 (1995)
- 28) Nomura S, Hirakawa K, Nagoshi J, Hirota S, Kim H-M, Takemura T, Nakase N, Takaoka K, Matsumoto S, Nakajima Y, Takebayashi K, Takano-Yamamoto T, Ikeda T and Kitamura Y : Method for detecting the expression of bone matrix protein by in situ hybridization using decalcified mineralized tissue. *Acta Histochem Cytochem* 26, 303-309 (1993)
- 29) Chomczynski P and Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159 (1987)
- 30) Ruat M, Molliver M E, Snowman A M and Snyder S H : Calcium sensing receptor: Molecular cloning in rat and localization to nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3161-3165 (1995)
- 31) Schramm M, Thomas G, Towart R and Franckowiak G : Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca^{2+} channels. *Nature* 303, 535-537 (1983)
- 32) Stuenkel E L : Effects of membrane depolarization on intracellular calcium in single nerve terminals. *Brain Res* 529, 96-101 (1990)

- 33) Loev B, Ehrreich S J and Tedeschi R E : Dihydropyridines with potent hypotensive activity prepared by the Hantzsch reaction. *J Pharm Pharmac* 24, 917-918 (1972)
- 34) Gundberg C M, Hauschka P V, Lian J B and Gallop P M : Osteocalcin: isolation, characterization, and detection. *Method Enzymol* 107, 516-544 (1984)
- 35) Price P A, Otsuka A S, Poser J W, Kristaponis J and Raman N : Characterization of a γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 73, 1447-1451 (1976)
- 36) Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y and Nomura S : Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem* 42, 885-896 (1994)
- 37) Silver I A, Murrills R J and Etherington D J : Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 175, 266-276 (1988)
- 38) 小島至 : カルシウムと細胞情報. 第1版. 東京, 羊土社, 1992, 17-30.
- 39) LeBoff M S, Chang J, Henry M, Beaudoin D, Swiston L and Brown E M : Role of cytosolic calcium in the control of cAMP content by calcium in bovine parathyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* 45, 127-135 (1986)
- 40) Brown E M : Extracellular Ca^{2+} sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca^{2+} and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol Rev* 71, 371-411 (1991)
- 41) Nemeth E F and Scarpa A : Rapid mobilization of cellular Ca^{2+} in bovine parathyroid cells evoked by extracellular divalent cations.--Evidence for a cell surface calcium receptor. *J Biol Chem* 262, 5188-5196 (1987)
- 42) Shoback D M, Membreno L A and McGhee J G : High calcium and other divalent cations increase inositol trisphosphate in bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 123,

382-389 (1988)

- 43) Nygren P, Gylfe E, Larsson R, Johansson H, Juhlin C, Klareskog L, Akerstrom G J and Rastad J : Modulation of the Ca^{2+} -sensing function of parathyroid cells in vitro and in hyperparathyroidism. *Biochim Biophys Acta* 968, 253-260 (1988)
- 44) Fried R M and Tashjian A H Jr. : Unusual sensitivity of cytosolic free Ca^{2+} to changes in extracellular Ca^{2+} in rat C-cells. *J Biol Chem* 261, 7669-7674 (1986)
- 45) Muff R, Nemeth E F, Haller-Brem S and Fischer J A : Regulation of hormone secretion and cytosolic Ca^{2+} by extracellular Ca^{2+} in parathyroid cells and C-cells: role of voltage-sensitive Ca^{2+} channels. *Arch Biochem Biophys* 265, 128-135 (1988)
- 46) Brown E M, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger M A, Lytton J and Hebert S C : Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366, 575-580 (1993)
- 47) Brown E M, Vassilev P M and Hebert S C : Calcium ions as extracellular messengers. *Cell* 83, 679-682 (1995)
- 48) Tonna E A : An electron microscopic study of osteocyte release during osteoclasts in mice of different ages. *Clin Orthop Rel Res* 87, 311-317 (1972)
- 49) Elmaridi A S, Katchburian M V and Katchburian E : Electron microscopy of developing calvaria reveals images that suggest that osteoclasts engulf and destroy osteocytes during bone resorption. *Calcif Tissue Int* 46, 239-245 (1990)
- 50) Jones S J and Boyde A : Some morphological observations on osteoclasts. *Cell Tissue Res* 185, 387-397 (1977)
- 51) Parfitt A M : The cellular basis of bone remodeling: The quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. *Calcif Tissue Int* 36, S37-S45 (1984)
- 52) Väänänen H K : Mechanism of bone turnover. *Ann Med* 25, 353-359 (1993)
- 53) Parfitt A M : Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal

- framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55, 273-286 (1994)
- 54) Rodan G A and Martin T J : Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 33, 349-351 (1981)
- 55) Eriksen E F : Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocrine Rev* 7, 379-408 (1986)
- 56) Lean J M, Jagger C J, Chambers T J and Chow J W M : Increased insulin-like growth factor-1 mRNA expression in osteocytes precedes the increase in bone formation in response to mechanical stimulation. *J Bone Miner Res* 9 (Suppl.1), S142 (1994)
- 57) Price J S, Suswillo R F L, Houston B, Zaman G, Nijweide P J and Lanyon L E : The expression of bone morphogenetic proteins 6 and 7 in osteocytes: the effects of mechanical strain. *J Bone Miner Res* 10 (Suppl.1), S307 (1995)
- 58) Maejima A, Aoki M, Tsuritani K, Kamioka K, Hiura K, Miyoshi T, Hara H, Takano-Yamamoto T and Kumegawa M : Chick osteocyte-derived protein inhibits osteoclastic bone resorption. *Biochem J* (in press)
- 59) Jones S J , Gray C, Sakamaki H, Arora M, Boyde A, Gourdie R and Green C : The incidence and size of gap junctions between the bone cells in rat calvaria. *Anat Embryol* 187, 343-352 (1993)
- 60) 上岡寛, 久米川正好 : 骨組織における骨細胞の役割. *実験医学* 13(4), 36-40 (1995)

表1 各分画で回収された骨系細胞の個数

分画	処理時間 (分)	個数／頭蓋冠 ($\times 10^4$)
I	20	9.10 ± 1.48
II	20	4.80 ± 1.07
III	20	3.40 ± 2.60
IV	20	0.85 ± 0.47
V	30 ^a	0.14 ± 0.04
VI	20	1.34 ± 0.51

実験手順は、材料と方法に示された通りである。

各分画で単離された骨系細胞の総数を計測した。

各数値は実験5回分の平均値と標準偏差を示す。

^a：EDTAにて処理を行ったことを示す。

他はコラゲナーゼにて処理を行ったことを示す。

図1 骨系細胞をそれぞれ単離した後の新生ラット頭蓋冠の状態

A:摘出直後の頭蓋冠骨片、B:コラゲナーゼ2回処理後の頭蓋冠骨片、C:EDTA処理後の頭蓋冠骨片 (HE×200)

図2 各分画で単離培養した骨系細胞の顕微鏡写真像及びin situ ハイブリダイゼーション

骨系細胞は 1.0×10^4 個/dishの濃度で播種し、24時間培養した。

A, B, C:位相差顕微鏡写真像

D, E, F:アルカリフォスファターゼ染色

G~O:in situ ハイブリダイゼーション

G, H, I:オステオカルシンアンチセンスプローブ、J, K, L:カルシウム感受性受容体アンチセンスプローブ、M, N, O:カルシウム感受性受容体センスプローブ

A, D, G, J, M:分画I、B, E, H, K, N:分画III、C, F, I, L, O:分画VI (×200)

図3 各分画の骨系細胞のアルカリフォスファターゼ活性

骨系細胞は 1.0×10^4 個/dishの濃度で播種し、24時間培養した。実験方法に記した方法でアルカリフォスファターゼ活性を測定した。

^a: $P < 0.01$; 分画Iとの間に有意差を認めた。

^b: $P < 0.01$; 分画VIとの間に有意差を認めた。

図4 RT-PCR法によるカルシウム感受性受容体遺伝子の検出

新生仔ラットから骨細胞のみを含む骨片(頭蓋冠をEDTAによって処理した後の分画VIに相当する骨片)、肝臓、腎臓、肺の各種臓器を摘出し、AGPC法にてRNAを抽出した。続いて、実験方法に記したプライマーを用いてPCRを行った。PCRで増幅後電気泳動で分析し、エチジウムブロマイドで染色した。

Lane A:骨細胞(分画VIに相当する骨片)

Lane B:肝臓

Lane C:腎臓

Lane D:肺

M:DNAマーカー

図5 骨系細胞の細胞内カルシウムに及ぼす30 mMの細胞外液カルシウムの影響

骨系細胞は 1.0×10^4 個/dishの濃度で播種し、24時間培養した。実験方法に記した方法でindo-1カルシウムインジケータを用いて各分画の骨系細胞の細胞内カルシウム濃度を測定した。細胞内カルシウムの上昇度は静止状態からピーク時まで上昇した細胞内カルシウム濃度の値を示す。

^a: $P < 0.01$; 分画Iとの間に有意差を認めた。

^b: $P < 0.01$; 分画IIIとの間に有意差を認めた。

^c: $P < 0.01$; 分画Vとの間に有意差を認めた。

図6 分画VIの細胞の細胞内カルシウムに及ぼす細胞外液カルシウムの影響

細胞は 1.0×10^4 個/dishの濃度で播種し、24時間培養した。実験方法に記した方法でindo-1カルシウムインジケータを用いて各分画の骨系細胞の細胞内カルシウム濃度を測定した。細胞内カルシウムの上昇度は静止状態からピーク時まで上昇した細胞内カルシウム濃度の値を示す。

^{*}: $P < 0.01$; 1 mMの細胞外液カルシウム濃度との間に有意差を認めた。

図7 分画VIの細胞の細胞内カルシウムに及ぼす電位依存性カルシウムチャンネルのモジュレーターの影響

細胞は 1.0×10^4 個/dishの濃度で播種し、24時間培養した。実験方法に記した方法でindo-1カルシウムインジケータを用いて各分画の骨系細胞の細胞内カルシウム濃度を測定した。培地中に1 mMの細胞外液カルシウムが存在している状態でカルシウムチャンネルモジュレーターを作用させた。細胞内カルシウムの上昇度は静止状態からピーク時まで上昇した細胞内カルシウム濃度の値を示す。

A: 対照群 (非作用群)、B: カリウム (20 mM)、C: カリウム (40 mM)、D: BAY K 8644 (25 μ M)、E: ニカルジピン (10 nM)、F: ニフェジピン (25 μ M)、G: カルシウム (30 mM)、H: ニカルジピン (10 nM) + カルシウム (30 mM)、I: ニフェジピン (25 μ M) + カルシウム (30 mM)

^{*}: $P < 0.01$; 対照群 (非作用群) との間に有意差を認めた。

图 1

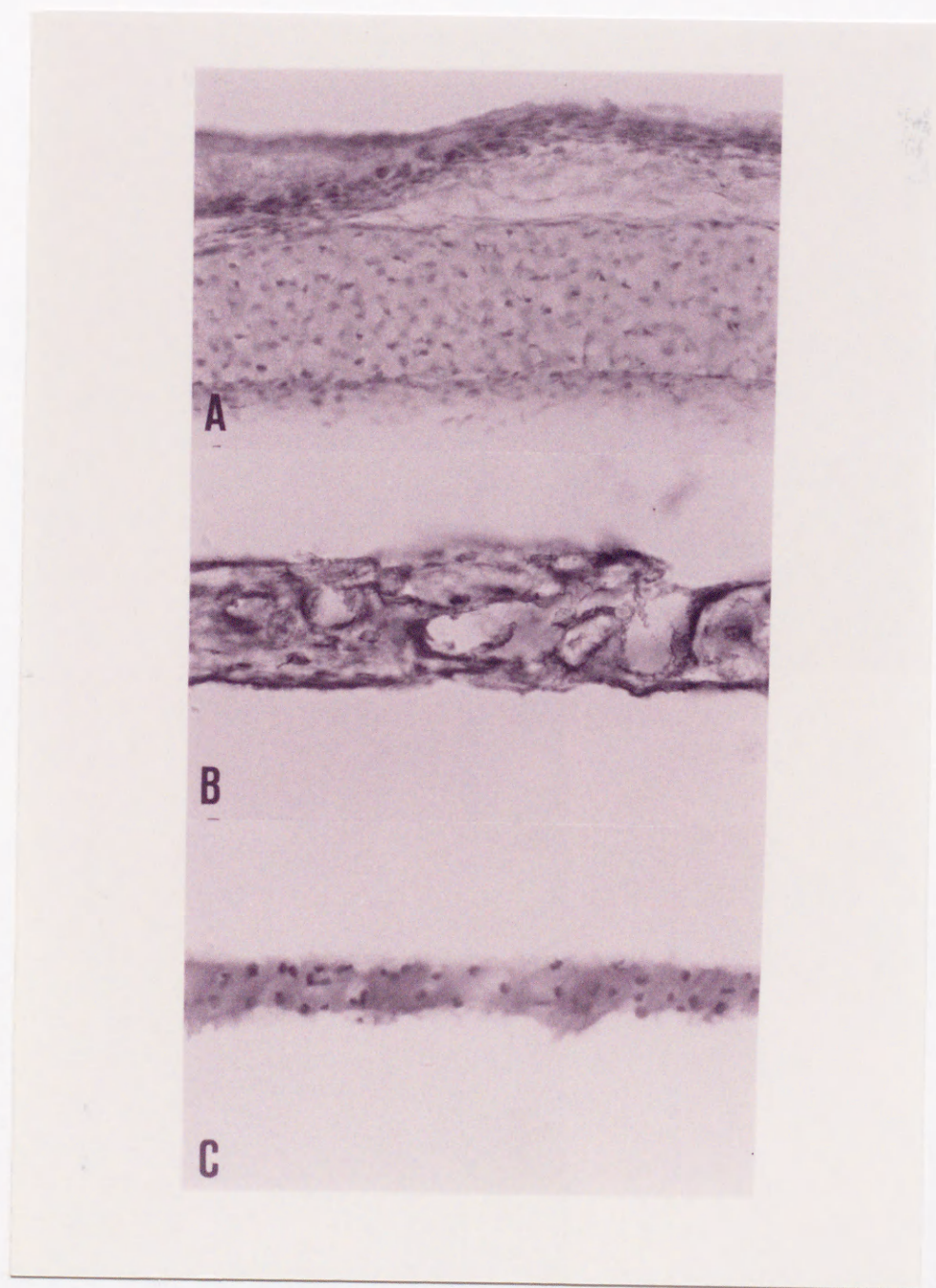


図 2

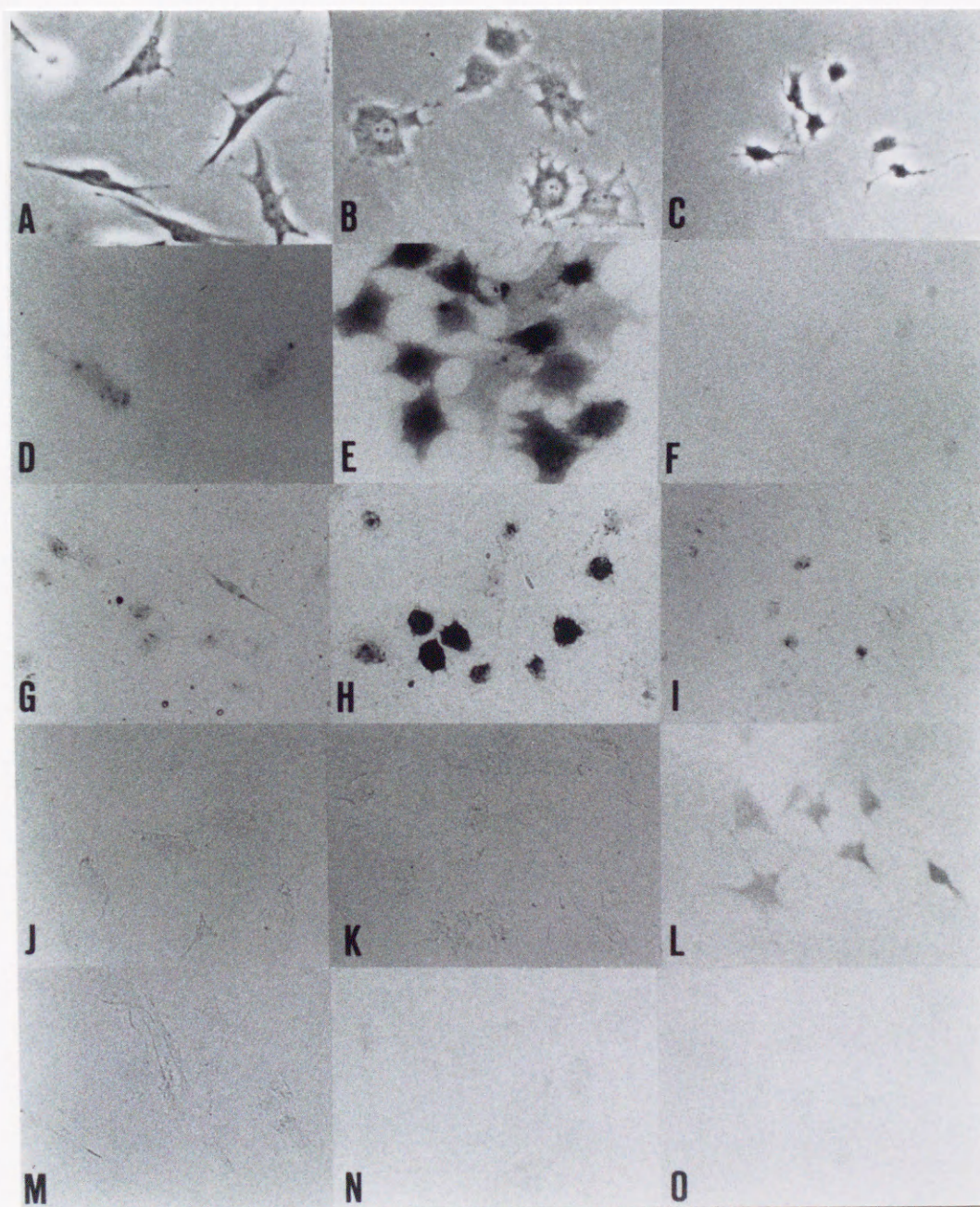


図3

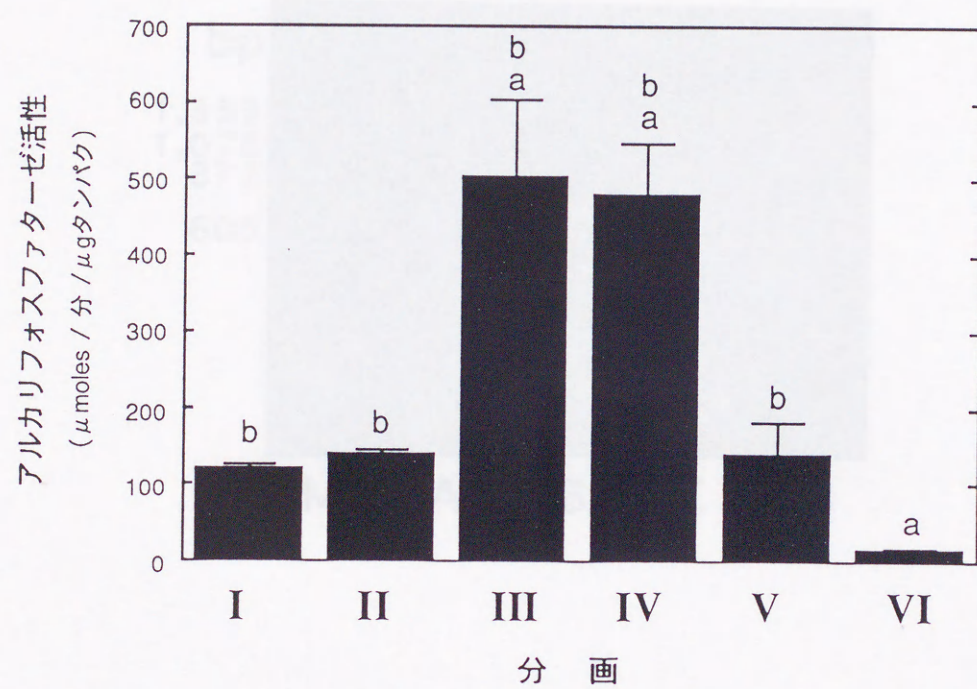


図4

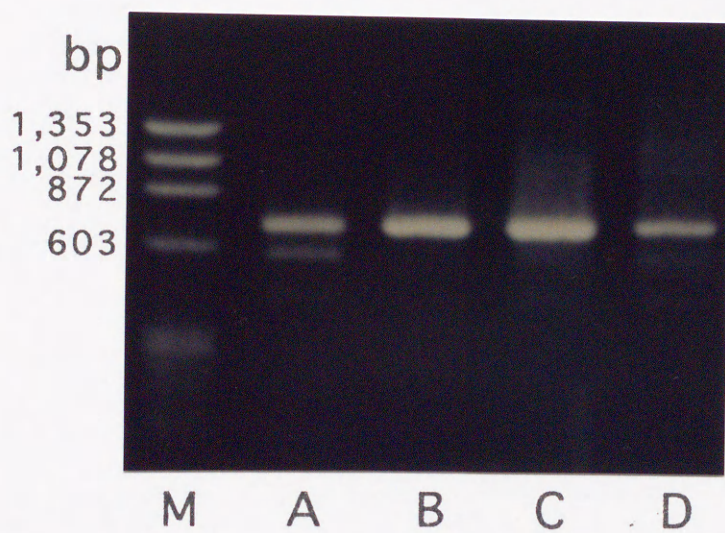


図5

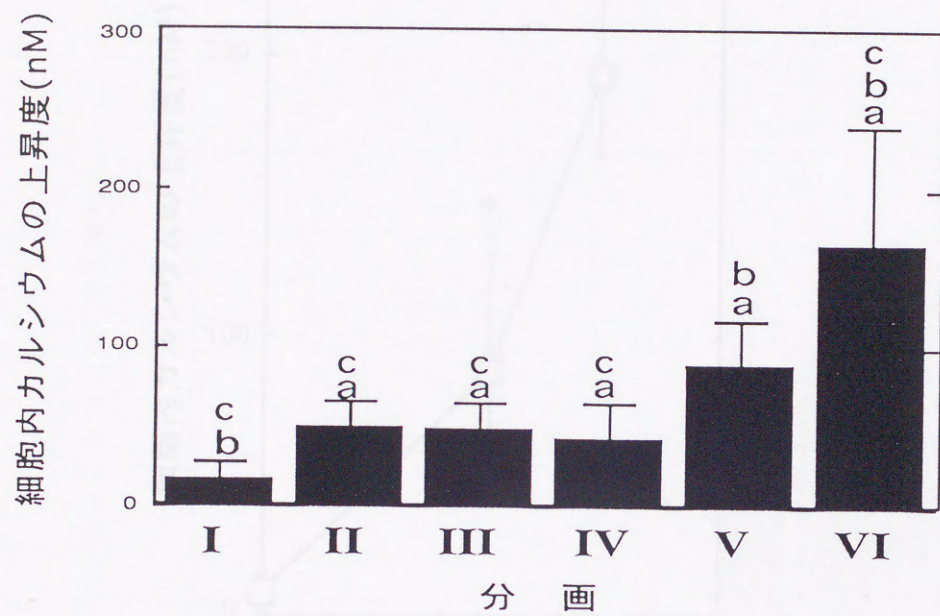


図6

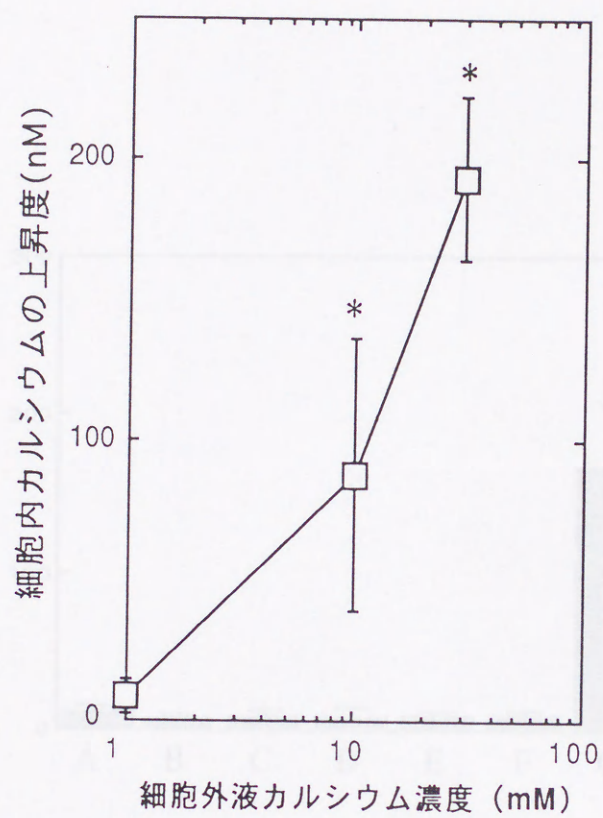
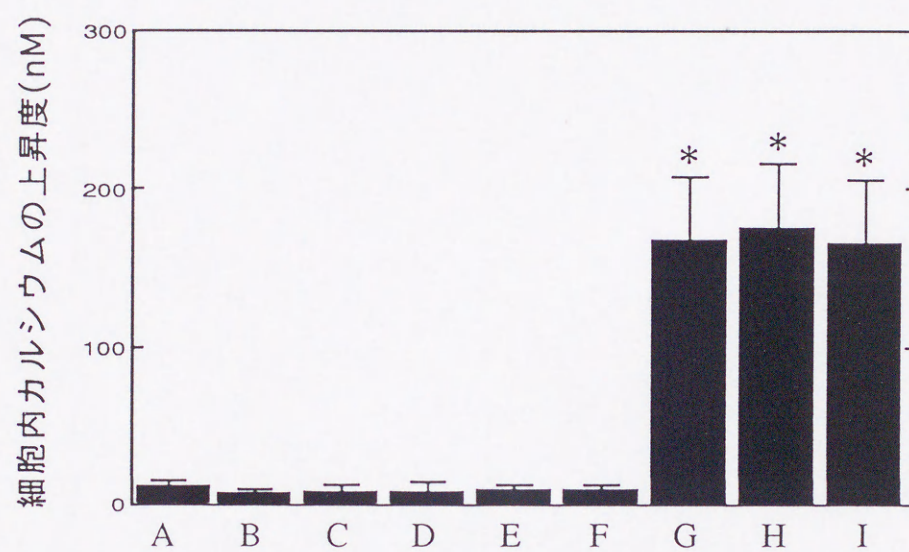
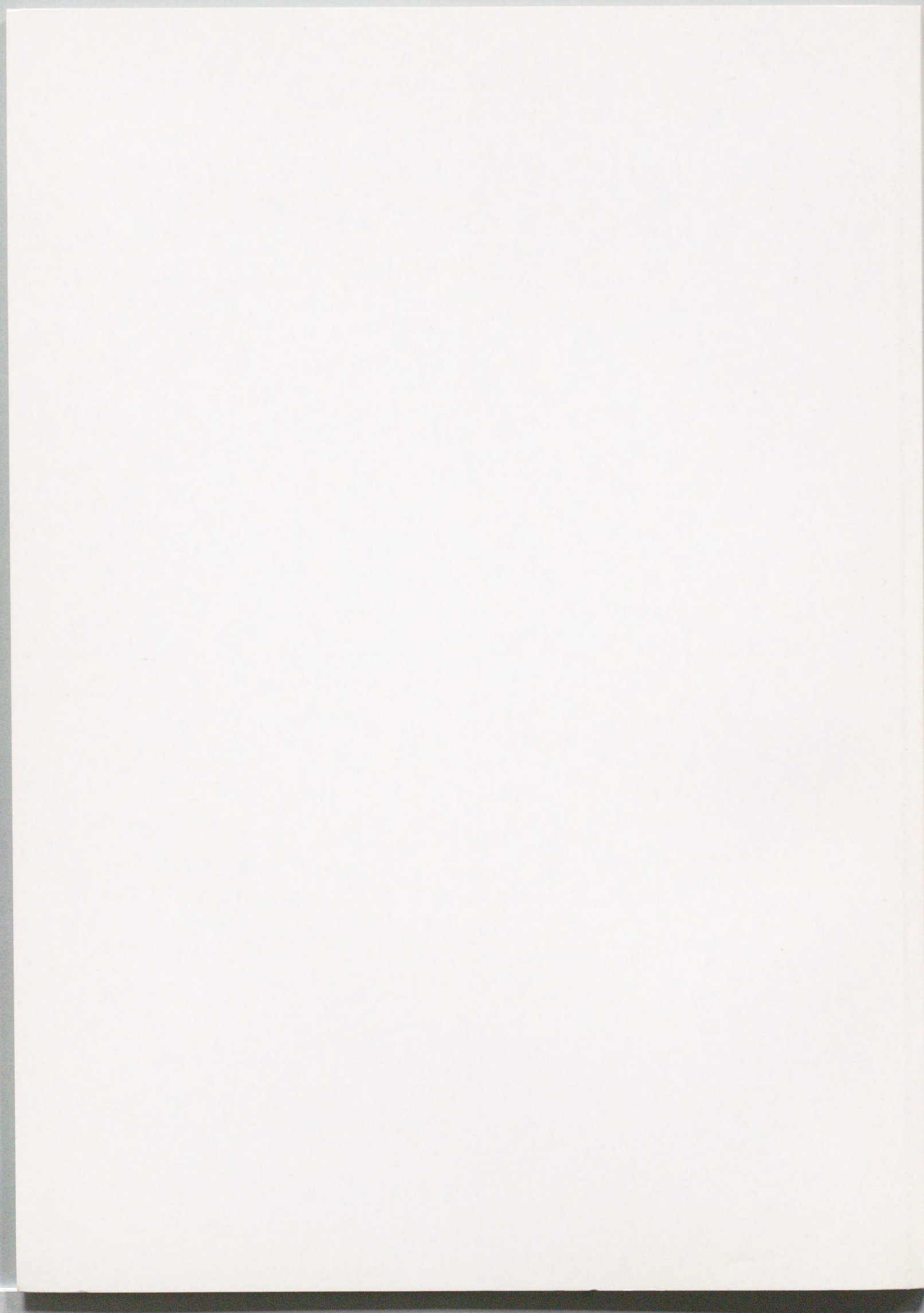





図7





論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 乙	歯第 118号	氏名	三木 善樹
審査委員		主査	山本 照子	
		副査	林 良夫	
		副査	細井 和雄	

題 目

骨芽細胞から骨細胞への分化に伴うカルシウム
感受性レセプターの発現

要 旨

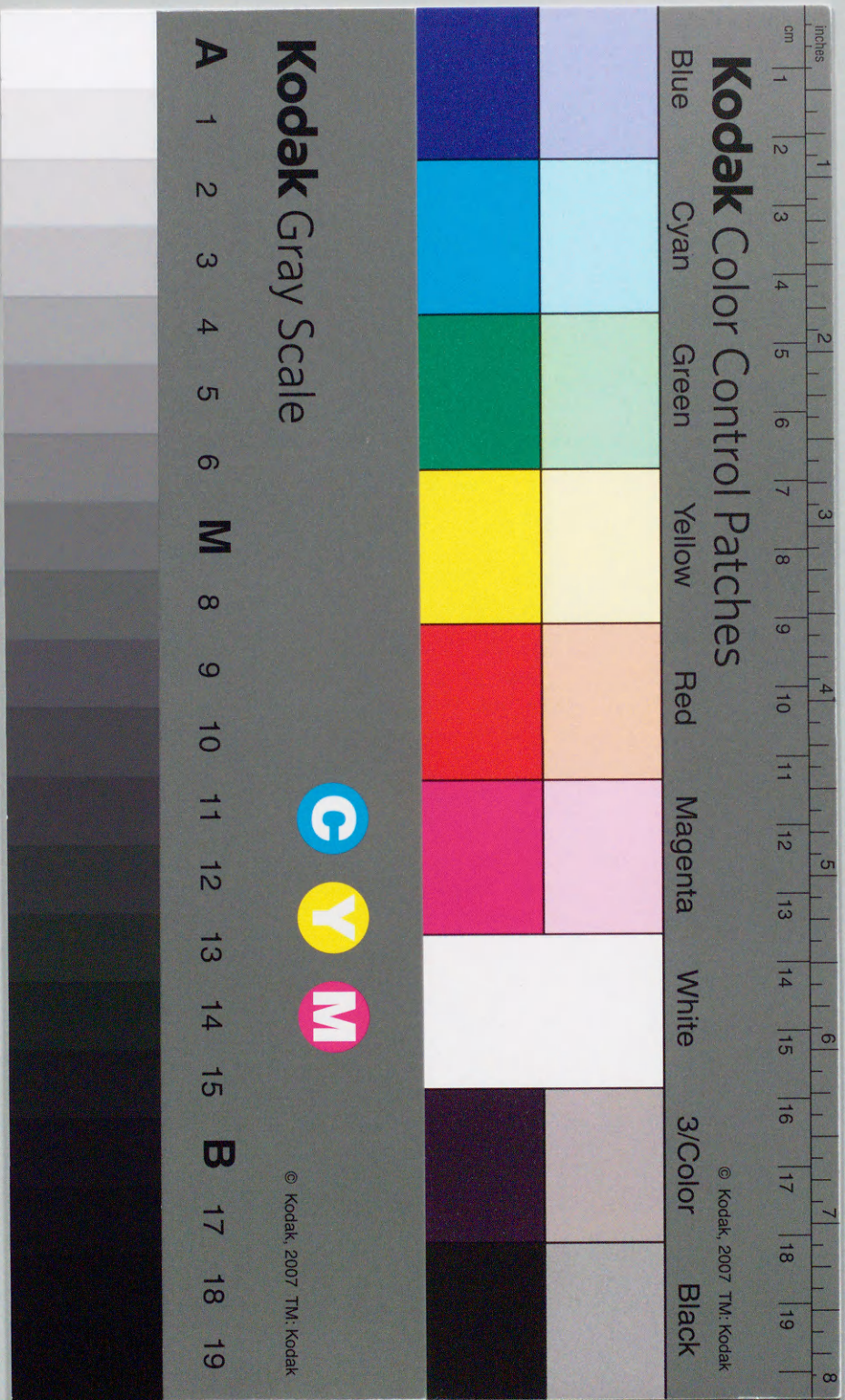
歯科矯正治療において、骨整形力および歯の移動に伴い骨の吸収と形成、すなわち、リモデリングが行われている。骨を構成する細胞の中でも骨細胞は骨組織を構成する細胞中で最も数が多く、多くの突起を伸ばして他の骨細胞や骨表面の骨芽細胞、破骨細胞とギャップジャンクションを介して細胞間ネットワークを形成し、外界の変化を察知できる状態にある。現在までのところ、そのシグナル物質として細胞内カルシウム(Cai)が重要な役割を果たしていると考えられ、骨表面の骨吸収部位での情報を骨細胞が骨深部へ伝達する役割をもつ可能性が示唆されている。一方、骨細胞は骨芽細胞より分化するが、分化に伴い細胞小器官の消失、核対細胞質比率の増加等の形態的变化をすることは知られている。しかし、骨系細胞の分化に関する機能的な変化についての詳細は明らかではない。

本研究は、新生仔ラット頭蓋冠をコラゲナーゼおよびキレート剤にて処理し、分化段階の異なる6種の骨系細胞の分画を得た。これらの細胞分画を用いて、分化に伴う骨系細胞の機能的な変化について検討を行い、以下の結果を得た。

- 1) 分画Iの細胞は細長く、紡錘形をしており、線維芽細胞と思われる形態をしていた。分画IIから分画IVの細胞は星状あるいは多角形をしており、骨芽細胞と思われる形態をしていた。分画VIの細胞は小型で、細胞突起を多数伸長しており、成熟した骨細胞と思われる形態をしていた。
- 2) 骨芽細胞の分化のマーカーであるALPase活性、オステオカルシン遺伝子の発現は分画IIIで最も高く、骨芽細胞の性質を示した。
- 3) 細胞外カルシウム(Cae)の上昇に対する感受性は骨系細胞の分化に伴って上昇し、分画VIが最も高かった。
- 4) 分画VIの細胞はCaeの濃度に依存して即時的にCaiが上昇し、1.0mM以上の濃度より観察された。この上昇は膜脱分極や電位依存性カルシウムチャンネルに依存しなかった。
- 5) 分画VIの細胞にカルシウム感受性レセプター遺伝子の発現がみられた。

以上の結果より、骨芽細胞から骨細胞への分化に伴いカルシウム感受性レセプターが発現し、Caeの変化に応答することが明らかとなった。

本研究によって得られた成果は骨代謝の分野に新知見を加え、その進歩に大きく貢献するものと考えられる。したがって、本論文は博士(歯学)の学位授与に十分値するものと考えられる。



Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A

1

2

3

4

5

6

M

8

9

10

11

12

13

14

15

B

17

18

19